

ABSTRACT 505210/1991

008228815

WPI Acc No: 1990-115816/199015

Related WPI Acc No: 1988-205305

XRAM Acc No: C90-050855

Elastase inhibiting polymers - comprises inhibitory peptide moieties linked to polymer back-bone, giving increased half-life and activity
Patent Assignee: CZECHOSLOVAK ACAD SCI (CESK); UNIV KENTUCKY (KENT); CZECHOSLOVAK ACAD OF SCI (CZSC-N); DIGENIS G A (DIGE-I); UNIV KENTUCKY RES FOUND (KENT)

Inventor: AGHA B J; BANKS W R; DIGENIS G A; RYPACKE F; AGHA B; RYPACEK F
Number of Countries: 016 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicant No	Kind	Date	Week
WO 9002558	A	19900322				199015 B
EP 368449	A	19900516	EP 89309124	A	19890908	199020
AU 8942296	A	19900402				199025
EP 403605	A	19901227	EP 89910781	A	19890908	199101
JP 3505210	W	19911114	JP 89510119	A	19890908	199201
US 5162307	A	19921110	US 88242294	A	19880909	199248
			US 92857119	A	19920325	
EP 403605	A4	19910821	EP 89910781	A	19890000	199518

Priority Applications (No Type Date): US 08242294 A 19880909; US 92857119 A 19920325

Cited Patents: NoSR.Pub; US 4496689; US 4499082; US 4717722; US 4752576; US 4797396; US 4801610; US 4812474; 1.Jnl.Ref; US 3871964; US 4643991

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9002558 A
Designated States (National): AU JP
Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE
EP 368449 A
Designated States (Regional): ES GR
EP 403605 A
Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE
US 5162307 A 15 A61K-037/00 Cont of application US 88242294

Abstract (Basic): WO 9002558 A

Polymers of formula $P-(L-R)_q$ (I) are new where P = polymer contg. unit(s) of formula $(AmBn)$ where $(AmBn)$ is nonbiodegradable and has an ave. mol.wt. of 1,000-500,000; m,n = 5-3,000; A,B are same or different and at least one is capable of covalently bonding to L or R; R = gp. of formula C, D or E; where X = O or S; R' = n- or sec. 1-4C alkyl, 2-3C alkenyl, 2-4C alkynyl, 3-6C cycloalkyl or benzyl; R2 = phenyl opt. substd. by NO2 or pentafluoro, benzyl, $-CH_2(CF_2)_2CF_3$, 1-lower alkyl or 1-phenyltetrazolyl, 2-thioxo-3-thiazolidinyl, pyridyl or benzothiazolyl; if when R2 is p-nitrophenyl, R1 is not t-Bu, benzyl or cyclohexyl, and when X = S, R2 is not benzyl; each R being covalently bonded to L or one of A and B; L = covalent bond or linker gp; and $q = 1-(m+n)$.

USE/ADVANTAGE - Useful as elastase inhibitors without affecting serine proteases, bovine pancreatic trypsin and chymotrypsin, and so used in treatment of pulmonary emphysema and related disease. Coupling of the active peptides to the polymer increases biological half-life and/or inhibitory activity. Doses are 0.1-300(1-30), esp. ca. 12 mg/kg.

Partial Translation
of
Japanese Patent Laid Open Publication No.505210/1991

Application No. : 510119/1989

Application Date : September 8, 1989

Date of Laid Open : November 14, 1991

Priority : U.S.Patent Serial No. 242,294 filed on
September 9, 1988

Applicant : University of Kentucky Research Foundation

The applicant name was transliterated from
the Japanese Katakana, so are not sure about
the accuracy.

Partial translation

- omitted -

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

平3-505210

⑬ Int. Cl.³C 07 K 5/06
17/08

識別記号

Z

庁内整理番号

8318-4H
7731-4H※審査請求 未請求
予備審査請求 未請求

⑭ 公表 平成3年(1991)11月14日

部門(区分) 3(2)

(全 19 頁)

⑮ 発明の名称 エラストマーゼ阻害ポリマーおよび方法

⑯ 特 願 平1-510119

⑰ 出 願 平1(1989)9月8日

⑱ 翻訳文提出日 平2(1990)5月9日

⑲ 国際出願 PCT/US89/03908

⑳ 国際公開番号 WO90/02558

㉑ 国際公開日 平2(1990)3月22日

優先権主張 ㉒ 1988年9月9日 ㉓ 米国 (U S) ㉔ 242,294

⑳ 発 明 者 デイゲニス, ジョージ, エイ.

アメリカ合衆国40502 ケンタッキー州レキシントン, ウッドモン
ト ドライブ 2133㉕ 出 願 人 ユニバーシティー オブ ケン
タッキー リサーチ ファウン
デーションアメリカ合衆国40506-0032 ケンタッキー州, レキシントン, ユ
ニバーシティー オブ ケンタッキー, アドミニストレーション
ビルディング (番地なし)

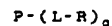
㉖ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外3名

㉗ 指 定 国 A T (広域特許), A U, B E (広域特許), C H (広域特許), D E (広域特許), F R (広域特許), G B (広域特
許), I T (広域特許), J P, L U (広域特許), N L (広域特許), S E (広域特許)

最終頁に続く

浄書(内容に変更なし)
請求の範囲

1. 式:



(式中、

Pは式(AmBn)(式中、(AmBn)は実質的に非生物分解性で約1,000から500,000ドルトンの平均分子量をもち、mとnは同じことも異なることもありそして約5から3,000であり、AおよびBは同一のことも異なることもあり、そしてAとBの少なくとも一つはLおよびRの一つに共有結合することができる)をもつ少なくとも一つの単位からなる重合体であり、

Rは式:



(式中、

Xは炭素または炭素であり、

R¹は直鎖および2級分枝鎖(C₁-C₄)アルキル、(C₅-C₈)アルケニル、(C₉-C₁₀)アルキニル、(C₁₁-C₁₄)アルキニル、(C₁₅-C₁₈)シクロアルキル、およびベンジルからなる群から選ばれ、

R²は置換および非置換フェニル(この置換基はニトロおよびペンタフルオロからなる群から選ばれ、ベンジル、CH₂CF₂CF₂CF₃、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、2-チオキノ-

-チアゾリジニル、ピリジルおよびベンゾチアゾリルからなる群から選ばれ、ただしR²がp-ニトロフェニルである場合には、R¹はtertiaryブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外の基であり、またXが炭素である場合には、R²はベンジル以外の基であることを条件とする)を有する化合物C、

式:



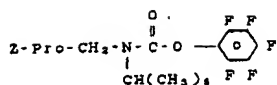
(式中、

XはOまたはSであり、

R²はフェニル、ニトロフェニル、フルオロフェニル、-CH₂CF₂CF₂CF₃、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、ベンジル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジル、およびベンゾチアゾリルからなる群から選ばれ、

R¹は直鎖または2級分枝鎖(C₁-C₄)アルキル、(C₅-C₈)アルケニル、(C₉-C₁₀)アルキニル、(C₁₁-C₁₄)アルキニル、(C₁₅-C₁₈)シクロアルキルおよびベンジルからなる群から選ばれ、ただしR²がp-ニトロフェニルである場合には、R¹はtertiaryブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外の基であり、またXが炭素である場合には、R²はベンジル以外の基であることを条件とする)を有する化合物D、および

式:



(式中、

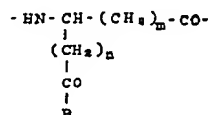
Zは-O-Suc-Ala-Alaである)を有する化合物Eからなる群から選ばれる化合物で、前記の各RはLへ、あるいはAおよびBの一つへ共有結合しており、

Lは1本の共有結合および1個のリンカー基(これはAおよびBの一方およびRへ共有結合している)からなる群から選ばれ、

qは約1から10+0までである]

て表わされる重合体。

2. Aは式:



(式中、mは0か1、nは1か0であり、RはOH、2-ヒドロキシエチルアミン、2-ヒドロキシプロピルアミン、3-ヒドロキシプロピルアミン、2,3-ジヒドロキシプロピルアミン、2-ヒドロキシブチルアミンおよび4-ヒドロキシブチルアミンからなる群から選ばれる)を有する化合物であり、また

Bは前記式(1)(式中、RはNH₂、NH-NH₂、-NH-R'-NH₂

体。

7. AとBは同一である、請求項第1項記載の重合体。

8. Lは式-NH-R'-NH-【式中、Rは1本の共有結合、(C₂-C₆)アルキル、(C₂-C₆)ヒドロキシルアルキル、および(C₆-C₆)アリーールからなる群から選ばれ、あるいはこれらアルキル基のうちの2から4個はN、0および8からなる群から選ばれるヘテロ原子によりまたは-NH-CO-により互に結合される]を有するリンカー残基である、請求項第1項記載の重合体。

9. Lは共有結合である、請求項第1項記載の重合体。

10. RはC、

R'は-CH(CH₃)₃、

R''は1-メチルテトラゾール

である、請求項第1項記載の重合体。

11. RはC、そして

R'は-CH(CH₃)₃、-CH₂CH₂CH₃、-CH₃、-C(CH₃)₃、シクロプロピル、シクロヘキシル、およびベンジルからなる群から選ばれる、請求項第1項記載の重合体。

12. RはC、そして

R'はp-ニトロフェニル、フェニル、ペルフルオロフェニル、-OCH₂CF₂CF₂CF₃、1-低級アルキルテトラゾール、1-フェニルテトラゾール、ピリジル、2-チオキノ-3-チアゾリジニルおよびベンジチア

(R'は(C₂-C₁₀)アルキルまたは(C₆-C₆)アリーールである)、およびNH-R''-OH(R''は(C₂-C₆)アルキルまたは(C₆-C₆)アリーールである)からなる群から選ばれる]を有する化合物である、請求項第1項記載の重合体。

3. 重合体Pはポリ-アルファ-1-ペプチ-(N(2-ヒドロキシエチル)-D、L-アスパラギンである、請求項第1項記載の重合体。

4. AはN-2-ビニルピロリドン、N-ヒドロキシプロピルメタクリルアミド、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、およびアクリルアミドからなる群から選ばれ、

Bはアミノ(C₂-C₆)アルキルメタクリルアミド、アミノ(C₂-C₆)アルキルアクリルアミド、アミノ(C₂-C₆)アルキルマレイン酸モノアミド、0-アルキルアクリレートおよびメタクリレート(この場合アルキルは一般式CH₂-CH(OH)-CH₂-NH-R'-NH₂(式中、R'はC₂-C₆炭化水素である)で表わされる)からなる群から選ばれる、請求項第1項記載の重合体。

5. 重合体Pはポリ(N-2-ビニルピロリドン)から誘導される共重合体である、請求項第1項記載の重合体。

6. 重合体Pはデキストラン、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸およびヒアルロン酸からなる群から選ばれる多糖類である、請求項第1項記載の重合

体。ポリリルからなる群から選ばれる、請求項第1項記載の重合体。

13. RはD、

R'はp-ニトロフェニル、そして

R''はイソプロピル

である、請求項第1項記載の重合体。

14. RはD、

R'は1-メチルテトラゾリル、そして

R''はイソプロピル

である、請求項第1項記載の重合体。

15. RはDであり、そして下記化合物:

p-ニトロフェニルN-(メチルスクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-イソプロピルカルバメート、

フェニルN-(メチルスクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-イソプロピルカルバメート、

ペンタフルオロフェニルN-(メチルスクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-イソプロピルカルバメート、

ヘキサフルオロブチルN-(メチルスクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-イソプロピルカルバメート、

1-メチル-5-チアゾリジニルN-(メチルスクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリルメ

チル)-N-イソプロピルチオールカルバメート、
 p-ニトロフェニル-N-(メチルスチニル-L-
 アラニル-L30アラニル-L-プロリルメチル)-N-
 プロピルカルバメート、

p-ニトロフェニル-N-(メチルスチニル-L-
 アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-
 シクロプロピルカルバメート、

p-ニトロフェニル-N-(メチルスチニル-L-
 アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-
 メチルカルバメート、

ペンタフルオロフェニル-N-(トリフルオロアセチル-
 L-アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-
 イソプロピルカルバメート、

1-メチル-5-テトラゾリル-N-(メチルスチニル-
 L-アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-
 シクロプロピルチオールカルバメート、

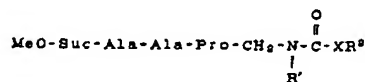
1-メチル-5-テトラゾリル-N-(メチルスチニル-
 L-アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-
 プロピルチオールカルバメート、

1-メチル-5-テトラゾリル-N-(メチルスチニル-
 L-アラニル-L-アラニル-L-プロピルメチル)-N-
 プチルチオールカルバメート、

1-フェニル-5-テトラゾリル-N-(メチルスチニル-
 L-アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-
 イソプロピルチオールカルバメート、

リル、1-フェニルテトラゾリル、2-チオキソ-3-
 -チアゾリジニル、ピリジルおよびベンジチアゾリル
 からなる群から選ばれるが、ただしR²がp-ニト
 ロフェニルである場合には、R'はtert-ブチル、ベン
 ジルまたはシクロヘキシル以外の基であり、またXが
 硫黄である場合には、R²はベンジル以外の基である
 ことを条件とする)を有する化合物C、

式:



[式中、

XはOまたはSであり、

R²はフェニル、ニトロフェニル、フルオロフェニル、
 -CH₂CF₂CF₂CF₃、1-低級アルキルテトラゾリル、
 1-フェニルテトラゾリル、ベンジル、2-チオキソ-
 3-チアゾリジニル、ピリジルおよびベンジチアゾ
 リルからなる群から選ばれる、

R'は直鎖または2級分枝鎖(C₁-C₆)アルキル、(C₂-
 ~C₃)アルケニル、(C₃-C₄)アルキニル、(C₃-C₆)シ
 クロアルキル、およびベンジルからなる群から選ばれ
 るが、ただしR²がp-ニトロフェニルである場合に
 は、R'はtert-ブチル、ベンジルまたはシクロヘキ
 シル以外の基であり、またXが硫黄である場合には、R²
 はベンジル以外の基であることを条件とする)を有す

および

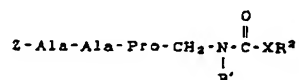
1-メチル-5-テトラゾリル-N-(メチルスチニル-
 L-アラニル-L-アラニル-L-プロリルメチル)-N-
 アリルチオールカルバメート

からなる群から選ばれる、請求項第1項記載の重合体、

16. 動物あるいはヒトにおける酵素エラスターゼを
 阻害する方法において、前記動物あるいはヒトへエラ
 スターゼ阻害量の請求項第1項記載の重合体を投与す
 ることからなる上記方法、

17. 1日当たり約0.1mg/kgから300mg/kgの量で
 重合体を投与する、請求項第16項記載の方法、

18. 式:



[式中、

ZはR²O-Suc-(ただし、R²は(C₁-C₃)アルキルであ
 る)およびCF₃CO-からなる群から選ばれる、

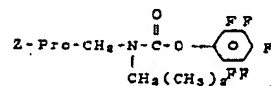
Xは硫黄または硫黄であり、

R'は直鎖および2級分枝鎖(C₁-C₆)アルキル、(C₂-
 ~C₃)アルケニル、(C₃-C₄)アルキニル、(C₃-C₆)シ
 クロアルキル、およびベンジルからなる群から選ばれる、

R²は置換および非置換フェニル(これら置換基は
 ユトロおよびペンタフルオロからなる群から選ばれる)、
 ベンジル、CH₂CF₂CF₂CF₃、1-低級アルキルテトラゾ

ル化合物D、および

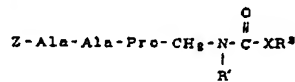
式:



(式中、ZはMeO-Suc-Ala-AlaおよびCF₃CO-Ala-Ala
 からなる群から選ばれる)を有する化合物E

からなる群から選ばれる化合物の生物学的半減期を増
 加させる方法において、前記化合物約1から3,000
 単位を平均分子量約1,000から500,000ドルト
 ンの實質的に非生物分解性の重合体に結合すること
 より遊離化合物の約10倍以上の生物学的半減期をも
 つの重合体を得ることからなる上記方法、

19. 式:



[式中、

ZはR²O-Suc-(R²は(C₁-C₃)アルキルである)およ
 びCF₃CO-からなる群から選ばれる、

Xは硫黄または硫黄であり、

R'は直鎖および2級分枝鎖(C₁-C₆)アルキル、(C₂-
 ~C₃)アルケニル、(C₃-C₄)アルキニル、(C₃-C₆)シ
 クロアルキル、およびベンジルからなる群から選ばれ、

R²は置換および非置換フェニル(これら置換基は

特表平3-505210(4)

ニトロ、ペンタフルオロからなる群から選ばれる)、ベンジル、 $\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジンおよびベンゾチアゾリルからなる群から選ばれるが、ただし R^2 がp-ニトロフェニルである場合には、 R' はtert-ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外の基であり、またXが炭素である場合には、 R^2 はベンジル以外の基であることを条件とする)を有する化合物C、

式:



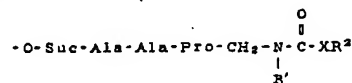
(式中、

XはOまたはSであり、

R^2 はフェニル、ニトロフェニル、フルオロフェニル、 $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、ベンジル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジン、およびベンゾチアゾリルからなる群から選ばれ、

R' は直鎖または2級分枝鎖($\text{C}_1\sim\text{C}_6$)アルキル、($\text{C}_2\sim\text{C}_3$)アルケニル、($\text{C}_2\sim\text{C}_4$)アルキニル、($\text{C}_3\sim\text{C}_6$)シクロアルキル、およびベンジルからなる群から選ばれるが、ただし R^2 がp-ニトロフェニルである場合には、 R' はtert-ブチル、ベンジルまたはシクロヘキ

シル以外の基であり、またXが炭素である場合には、 R^2 はベンジル以外の基であることを条件とする)を有する化合物D、および式:



(式中、

Xは炭素または炭素であり、

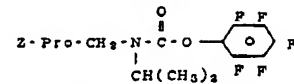
R' は直鎖および2級分枝鎖($\text{C}_1\sim\text{C}_6$)アルキル、($\text{C}_2\sim\text{C}_3$)アルケニル、($\text{C}_2\sim\text{C}_4$)アルキニル、($\text{C}_3\sim\text{C}_6$)シクロアルキル、およびベンジルからなる群から選ばれ、

R^2 は置換および非置換フェニル(この置換基はニトロおよびペンタフルオロからなる群から選ばれる)、ベンジル、 $\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジンおよびベンゾチアゾリルからなる群から選ばれるが、ただし R^2 がp-ニトロフェニルである場合には、 R' はtert-ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外の基であり、またXが炭素である場合には、 R^2 はベンジル以外の基であることを条件とする)を有する化合物C、

式:



ル以外の基であり、またXが炭素である場合には、 R^2 はベンジル以外の基であることを条件とする)を有する化合物D、および式:



(式中、ZはMeO-Suc-Ala-Alaおよび $\text{CF}_3\text{CO-Ala-Ala}$ からなる群から選ばれる)を有する化合物Eからなる群から選ばれる化合物のエラストーゼ酵素阻害活性を増加させる方法において、前記化合物約1から3,000単位を平均分子量約1,000から500,000ダルトンの実質的に非生物分解性の重合体に結合して遊離化合物の活性より約10倍以上大きいエラストーゼ酵素阻害活性を有する請求項第1項記載の重合体を得ることからなる上記方法。

20. 動物あるいはヒトにおける酵素エラストーゼを阻害する方法において、前記動物あるいはヒトへエラストーゼ阻害量の式:

$$\text{P-(L-R)}_q$$

(式中、

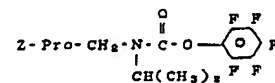
Pは式(ABn) (式(ABn)は実質的に非生物分解性で、約1,000から500,000ダルトンの平均分子量をもち、nとmは同じことも異なることもあり、そして約5から3,000であり、AとBは同じことも異なることもあり、そしてAおよびBの少なくとも一つ

(式中、

XはOまたはSであり、

R^2 はフェニル、ニトロフェニル、フルオロフェニル、 $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、ベンジル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジン、およびベンゾチアゾリルからなる群から選ばれ、

R' は直鎖または2級分枝鎖($\text{C}_1\sim\text{C}_6$)アルキル、($\text{C}_2\sim\text{C}_3$)アルケニル、($\text{C}_2\sim\text{C}_4$)アルキニル、($\text{C}_3\sim\text{C}_6$)シクロアルキル、およびベンジルからなる群から選ばれるが、ただし R^2 がp-ニトロフェニルである場合には、 R' はtert-ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外の基であり、またXが炭素である場合には、 R^2 はベンジル以外の基であることを条件とする)を有する化合物D、および式:



(式中、

Zは-O-Suc-Ala-Alaである)を有する化合物Bからなる群から選ばれる化合物で、前記各RはLへあるいはAおよびBの一方へ共有結合し、

Lは1本の共有結合および1個のリンカー基(これはAおよびBの一方およびRへ共有結合している)か

らなる群から選ばれ、

q は約 1 から $m + n$ までである)

で表わされる重合体を投与することからなる上記方法、

21 重合体を 1 日当り約 0.1 ㎎/kg から 300 ㎎/kg の量で投与する、請求項第 20 項記載の方法、

エラスターゼ阻害ポリマーおよび方法

技術分野

本発明は、酵素エラスターゼの強力なポリマー阻害剤、ならびに動物およびヒトにおけるその酵素活性を阻害するためのそれらの利用に関する。本発明はまた、親水性で可溶性で生体内で実質的に分解を受けないポリマーに多くの単位のペプチドエラスターゼ阻害剤を結合させることによつて、この阻害剤の生物学的半減期および/またはエラスターゼ酵素阻害活性を増大させる方法に関する。

背景技術

多形核白血球およびマクロファージからのプロテアーゼ、とくにエラスターゼ(ヒト白血球エラスターゼおよびカタプシン)は、炎症、関節炎および気腫に伴う慢性組織破壊の原因と考えられている。感染または炎症時には、正常な肺は、プロテアーゼ阻害剤 α_1 -アンチトリプシンによつて蛋白分解の消化から保護される。その保護機構は、遺伝的なまたは他の原因による α_1 -アンチトリプシン欠損患者では作動しない。 α_1 -アンチトリプシンに代用できる合成エラスターゼ阻害剤はしたがつて、肺気腫や関連疾患の治療に有用である。

数種のエラスターゼ阻害剤がこれまで文献に報告されている。この中には、P.M.Tunby および J.C.Powers: 'Inhibition of Human Leukocyte Elastase by Peptide Chloromethyl Ketones', FEBS Lett. 50: 359~361 (1975), J.C.Powers, B.F. Gupton, A.D.Harley, N.Nishino および R.J.Whitley: 'Specificity of Porcine Pancreatic Elastase, Human Leukocyte Elastase and Cathepsin G, Inhibition with Peptide Chloromethyl Ketones', Biochem. Biophys. Acta. 485: 156~166 (1977) に記載されているペプチドクロモメチルケトン; C.P.Dorn, M.Zimmerman, S.S.Yang, E.C.Yurewicz, B.M.Ashe, R.Frankshun および H.Jones: 'Proteinase Inhibitors. 1. Inhibitors of Elastase', J.Med. Chem., 20: 1464~1468 (1977), J.C.Powers および B.F. Gupton: 'Reaction of Serine Proteinases with Azaamino Acid and Aza-peptide Derivatives', Meth. Enzymol., 46: 208~216 (1977) に記載されているアザペプチド; T.Yoshimura, L.N.Barker および J.C.Powers: 'Specificity and Reactivity of Human Leukocyte Elastase, Porcine Pancreatic Elastase, Human Granulocyte Cathepsin G, and Bovine Pancreatic Elastase, Human Granulocyte Cathepsin G, and Bovine Pancreatic Chymotrypsin

with Arylsulfonyl Fluorides. Discovery of a new series of potent and specific irreversible Elastase Inhibitors', J.Biol. Chem., 257: 5077~5084 (1982) に記載されているスルホニルフルオリド; M.Zimmerman, H.Norman, D.Mulvey, H.Jones, R.Frankshun および B.M.Ashe: 'Inhibition of Elastase and Other Serine Proteinases by Heterocyclic Acylating Agents', J.Biol. Chem., 255: 9848~9851 (1980), B.M.Ashe, R.L.Clark, H.Jones および M.Zimmerman: 'Selective Inhibition of Human Leukocyte Elastase and Bovine α_1 -Chymotrypsin by Novel Heterocycles', J.Biol. Chem., 256: 11603~11606 (1981) に記載されている異項環アシル化剤; W.C.Greutag, R.C.Badger, T.D.Ocain, D.Felder, J.Frankson および M.Theodorakis: Biochem. Biophys. Res. Commun., 95: 1890 (1980) に記載されているイミダゾール N-カルボキシアミド; R.E.Scofield, R.P.Warner および P.Wold: 'p-Nitrophenyl Carbamates as Active-Site-Specific Reagents for Serine Proteinases', Biochemistry, 16: 2492 (1977) に記載されている p-ニトロフェニルカルバメートがある。

ある種のペプチドクロモメチルケトンは、動物モデルにおいてエラスターゼ誘発気腫の防止に有効なこと

が示されている (A. Jaoff および R. Dearing : 'Prevention of Elastase Induced Experimental Emphysema by Oral Administration of Synthetic Elastase Inhibitor', Am. J. Respir. Dis., 121: 1025~1030, 1980)。しかしながら、このような反応剤がヒトの気腫の治療に使用できるかどうかはかなり疑問である。通説的に使用された場合、これらの阻害剤中のアルキル化残基が毒性を示す可能性があるため、これは驚くべきことではない。ヒトへの使用に相当するためには、酵素阻害剤は高度の選択性を有し、しかも有害な副作用は最小限でなければならない。その結果として、大部分の薬剤は特定の酵素または受容体部位に可逆的に結合する分子である。たとえば、アセチルコリンエステラーゼの阻害剤として臨床的に用いられてきたカルバメートエステル、フィズスタグミンおよびネオスタグミンがその例である (A.O. Gilman, L.S. Goodman および A. Gilman: 'The Pharmacological Basis of Therapeutics', 101頁, Mac Millan Publishing Co., 1980)。

米国特許第4,643,991号、Tsujii K. ら : B.B. R.C., 122(2): 571 (1984) および Digenis, G.A. ら : J. Med. Chem., 29: 1468 (1986) には特異的な、活性部位に向けられた阻害剤で、この目的での他の従来化合物に伴う欠点をもたないペプタドエラスターゼ阻害剤が記載されている。

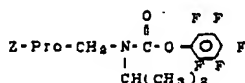
ジニル、ビリジルならびにベンゾチアゾリルからなる群より選ばれ、ただし、 R^2 が p -ニトロフェニルの場合には R' は三級ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外であり、 X が複素の場合には R^2 はベンジル以外である) で示される化合物 C、

以下の一般式



(式中、 X は O または S であり、 R^2 はフェニル、ニトロフェニル、フルオロフェニル、 $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2$ 、1-低級アルキルチオラジリル、1-フェニルチオラジリル、ベンジル、2-チオキソ-3-チアゾリジニル、ビリジルおよびベンゾチアゾリルからなる群より選ばれ、 R' は直鎖状および二級分岐鎖 ($\text{C}_1\sim\text{C}_4$) アルキル、($\text{C}_2\sim\text{C}_3$) アルケニル、($\text{C}_2\sim\text{C}_4$) アルキニル、($\text{C}_3\sim\text{C}_6$) シクロアルキルおよびベンジルからなる群より選ばれ、ただし、 R^2 が p -ニトロフェニルの場合には R' は三級ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外であり、 X が複素の場合には R^2 はベンジル以外である) で示される化合物 D、および

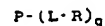
式



しかしながら、特異的に活性部位に向けられたエラスターゼ阻害剤にはなお、生物学的半減期の延長、エラスターゼ阻害剤活性の増強が求められている。

発明の開示

本発明は、式



(式中、 P は少なくとも1単位の式、 (AmBn) (式中、 (AmBn) は生体内で実質的に分解されず、平均分子量約1,000~5,000.000ダルトンで、 m および n は互いに同一であるかまたは異なり約5~3,000であり、 A および B は互いに同一であるかまたは異なり、 A および B の少なくとも一方は L および R の一方と共有結合できる) からなるポリマーであり、

R は、式



(式中、 X は酸基または複素であり、 R^2 は直鎖状および二級分岐鎖 ($\text{C}_1\sim\text{C}_4$) アルキル、($\text{C}_2\sim\text{C}_3$) アルケニル、($\text{C}_2\sim\text{C}_4$) アルキニル、($\text{C}_3\sim\text{C}_6$) シクロアルキルおよびベンジルからなる群より選ばれ、 R^2 は置換および非置換フェニル(この場合、置換基はニトロおよびペンタフルオロからなる群より選ばれ)、ベンジル、 $\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2$ 、1-低級アルキルチオラジリル、1-フェニルチオラジリル、2-チオキソ-3-チアゾリ

(式中、 Z は -O-Suc-Ala-Ala- である) で示される化合物からなる群より選ばれ、化合物であつて、それぞれ A および B の一方に共有結合し、

L は共有結合ならびに、 R と A および B の一方に共有結合するリンカー基からなる群より選ばれ、

q は約1から $m+n$ までである) で示されるポリマーに関する。

本発明はまた、上述のポリマーのエラスターゼ阻害量、および阻体からなるエラスターゼ酵素阻害組成物に関する。

また本発明の一部として、本発明のポリマーのエラスターゼ阻害量を、このような治療を必要とする動物またはヒトに投与することからなる動物またはヒトの酵素エラスターゼの阻害方法が包含される。

本発明はまた、上述の本発明のエラスターゼ酵素阻害組成物を、このような治療を必要とする動物またはヒトに投与することからなる動物またはヒトの酵素エラスターゼの阻害方法に関する。

本発明はまたその一部として、式



(式中、 X は酸基または複素であり、 R' は直鎖状および二級分岐鎖 ($\text{C}_1\sim\text{C}_4$) アルキル、($\text{C}_2\sim\text{C}_3$) アルケニル、($\text{C}_2\sim\text{C}_4$) アルキニル、($\text{C}_3\sim\text{C}_6$) シクロアルキルおよび

ベンジルからなる群より選ばれ、 R^2 は置換および非置換フェニル(この場合、置換基はニトロおよびペンタフルオロからなる群より選ばれる)、ベンジル、 $\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2$ 、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジニルならびにベンジチアゾリルからなる群より選ばれる。ただし、 R^2 がp-ニトロフェニルの場合には R' は三級ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外であり、Xが硫黄の場合には R^2 はベンジル以外である)で示される化合物C、

以下の一般式



(式中、XはOまたはSであり、 R^2 はフェニル、ニトロフェニル、フルオロフェニル、 $\text{-CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2$ 、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、ベンジル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジニルおよびベンジチアゾリルからなる群より選ばれ、 R' は直鎖または二級分岐鎖($\text{C}_1\text{-C}_4$)アルキル、($\text{C}_4\text{-C}_5$)アルケニル、($\text{C}_2\text{-C}_6$)アルキニル、($\text{C}_3\text{-C}_6$)シクロアルキルおよびベンジルからなる群より選ばれる。ただし、 R^2 がp-ニトロフェニルの場合には R' は三級ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外であり、Xが硫黄の場合には R^2 はベンジル以外

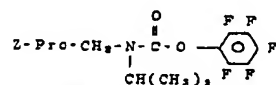
外である)で示される化合物C、

以下の一般式



(式中、XはOまたはSであり、 R^2 はフェニル、ニトロフェニル、フルオロフェニル、 $\text{-CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2$ 、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、ベンジル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジニルおよびベンジチアゾリルから選ばれる、 R' は直鎖または二級分岐鎖($\text{C}_1\text{-C}_4$)アルキル、($\text{C}_4\text{-C}_5$)アルケニル、($\text{C}_2\text{-C}_6$)アルキニル、($\text{C}_3\text{-C}_6$)シクロアルキルおよびベンジルから選ばれる。ただし、 R^2 がp-ニトロフェニルの場合には R' は三級ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外であり、Xが硫黄の場合には R^2 はベンジル以外である)で示される化合物D、および

式

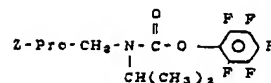


(式中、ZはMeO-Suc-Ala-Alaである)で示される化合物Eからなる群より選ばれる化合物のエラスターゼ阻害活性を増強する方法に関する。

RはそれぞれLまたはAおよびBの一方に共有結合

である)で示される化合物D、および

式



(式中、ZはO-Suc-Ala-Alaである)で示される化合物Eからなる群より選ばれる化合物の生物学的半減期を延長させる方法を含む。

RはそれぞれLまたはAおよびBの一方に共有結合し、Lは共有結合ならびに、RとAおよびBの一方に共有結合するリンカー基からなる群より選択され、qは約1からm+nまでである。

さらに、本発明はまた、式



(式中、Xは酸素または硫黄であり、 R^2 はフェニル、p-ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、 $\text{-O-CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2$ 、1-メチルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジニル、ベンジルおよびベンジチアゾリルからなる群より選ばれ、 R' は低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニルおよびベンジルから選ばれる。ただし、Rがp-ニトロフェニルの場合には R' は三級ブチル以外であり、Xが硫黄の場合にはRはベンジル以

し、Lは共有結合ならびに、RとAおよびBの一方に共有結合するリンカー基からなる群より選択され、qは約1からm+nまでである。

添付の図面を考慮しながら以下の詳細な説明を参照することによつて本発明がよりよく理解されるとき同時に、本発明とその利点のさらに完全な評価が容易になる。

図面の簡単な説明

第1図は、基質としてMeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NAを用いた各種ペプチジルカルバメート誘導体および α_1 -プロテアーゼ阻害剤(α_1 -PI)によるヒト白血球エラスターゼ(HLE)の阻害を示し、基質濃度は 1.62×10^{-4} M、酵素濃度は 3.4×10^{-8} Mである。

第2図は、例2に記載のポリマー結合化合物(ポリマーIV)の果糖分子重量分布を示す。

第3図は、例2のポリマー結合化合物(ポリマーIV)の吸収スペクトルを示す。

第4図は、化合物と例2のポリマー(化合物II)の反応混合物の様々な反応時間におけるゲル浸透クロマトグラフィー(OPC)分析を示す。

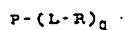
第5図は、エラスターゼ阻害ペプチドの例2のポリマー(化合物II)への結合を示す。

本発明の他の目的、利点および特徴は、本技術分野の熟練者には以下の説明から明らかであろう。

発明の最良の実施様式

本発明は、米国特許第4,643,991号に同じ発明者らによつて提供されたエラストーゼ酵素のペプチド阻害剤の生物学的半減期および/または効力を改善することの要請から生じたものである。本発明者らは、公知のペプチド阻害剤の多くの単位を可溶性の凝状ポリマーに共有結合させると、驚くべきことに生成物ポリマーがエラストーゼ酵素の阻害に関して高い生物学的半減期および/または効力を有することを発見した。これは全く予期し得ないものであつた。

本発明によつて提供されるポリマーは、式



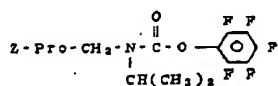
〔式中、Pは少なくとも1単位の式(AMBu)〔式中、(AMBu)は生体内で実質的に分解されず、平均分子量約1,000~500,000ダルトンで、 α および β は互いに同一であるかまたは異なり約5~3,000であり、AおよびBは互いに同一であるかまたは異なり、AおよびBの少なくとも一方はLおよびRの一方と共有結合できる〕からなるポリマーであり、

Rは式



〔式中、Xは酸素または硫黄であり、R'は直鎖状および二級分枝類(C₁-C₄)アルキル、(C₂-C₆)アルケニル、(C₂-C₆)アルキニル、(C₃-C₆)シクロアルキルおよびベンジルからなる群より選ばれ、

以外である)で示される化合物D、および式



〔式中、ZはMeO-Suc-Ala-Alaである)で示される化合物Eからなる群より選ばれる化合物であつて、それぞれLまたはAおよびBの一方に共有結合し、

Lは共有結合ならびに、RとAおよびBの一方に共有結合するリンカー基からなる群より選ばれ、

qは約1から $\alpha + \beta$ までである〕

で示される。

これらのポリマーは、*in vitro*および*in vivo*の両方で、エラストーゼ酵素の活性を阻害するのに適している。これらを*in vivo*でのエラストーゼ酵素の阻害に利用する場合に、もつぱら医薬的に許容されるポリマーが使用できる。これらは本技術分野において公知であつて、本明細書に詳しく言及するまでもない。

本発明のポリマーを酵素の*in vitro*阻害に利用する場合、これらは医薬的に許容されるものである必要はない。したがつて、多数のポリマーが*in vitro*で用いられる本発明の阻害ポリマーの設計に最終的に適している。

一般に、本発明に使用するのに適当なポリマーは水溶性ポリマーであり、好ましくは容易には生体内で分

とびベンジルからなる群より選ばれ、R²は置換または非置換フェニル(この場合、置換基はニトロ、ベンチルフルオロからなる群より選ばれる)、ベンジル、CH₂CF₂CF₂CF₃、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジルおよびベンジチアゾリルからなる群より選ばれる。ただし、R²がp-ニトロフェニルの場合にはR'は三級ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外であり、Xが硫黄の場合にはR²はベンジル以外である)で示される化合物C、

以下の一般式



〔式中、XはOまたはSであり、R²はフェニル、ニトロフェニル、フルオロフェニル、-CH₂CF₂CF₂CF₃、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、ベンジル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジルおよびベンジチアゾリルからなる群より選ばれ、R'は直鎖状または二級分枝類(C₁-C₄)アルキル、(C₂-C₃)アルケニル、(C₂-C₄)アルキニル、(C₃-C₆)シクロアルキルおよびベンジルからなる群より選ばれる。ただし、R²がp-ニトロフェニルの場合にはR'は三級ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外であり、Xが硫黄の場合にはR²はベンジル

解されない可溶性バックボーン構造を有し、したがつて長い生物学的半減期を有するポリマーである。さらに好ましいポリマーは、水溶性で実質的に生体内で分解されず、しかも可溶性のポリマーバックボーンを有するものである。ポリマーが示す高い可溶性は、ポリマーに結合された阻害性分子の酵素への接近を増大させるのに有効である。

本発明に使用するのに適当なポリマーは、主鎖にアミド結合を含有するポリマーである。とくに有用なものは、合成ポリアミノ酸の誘導体で、その例には α -ヒドロキシアルキル-D、L-アスパラギン酸アミドのランダム共重合体、たとえばポリ α -(N-(2-ヒドロキシエチル)-D、L-アスパラギン酸アミド)が含まれ、この場合2-ヒドロキシエチル側鎖の分面が上述の付加反応性残基によつて置換される。

適当なポリマーの他の例には、多種誘導体、とくにデキストラン、セルロース、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸およびヒアルロン酸の誘導体もしくはそれらの配合物または他のポリマーとの配合物がある。さらに他の、主ポリマー鎖に酸素原子を有する適当なポリマーの例には、ポリエーテルポリマーたとえばポリエーテルグリコール(ポリオキシラン)、ジビニルエーテルマレイン酸共重合体(ビラン共重合体、DIVEMA)等がある。

本発明に使用するのに適当なO-C-Cバックボーン

ンをもつポリマーの例には、異なる種類のモノマーの混合物から製造される共重合体がある。このようなポリマー群のひとつとして、反応性付加残基をもつ1種のモノマーとこのような残基を欠く他種のモノマーとを混合して形成させたポリマーがある。とくに適当なものは、親水性ビニルおよび/またはアクリル型モノマー、たとえばN-2-ビニルピロリドン、2-ヒドロキシプロピルメタクリル酸アミド、メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルならびに他の本技術分野でよく知られているアクリル酸およびメタクリル酸の親水性エステルおよびアミドから誘導される共重合体である。本発明に用いられる共重合体を製造するための付加反応性残基を含む適当なモノマーには、たとえばマレイン酸無水物ならびにアクリル酸およびメタクリル酸の反応性エステルが包含される。とくに適当なものは、たとえばアクリル酸グリシジルエステル、メタクリル酸グリシジルエステル、p-ニトロフェニル、N-ヒドロキシコハク酸イミド、メタクリル酸およびアクリル酸のペンタクロロフェニルまたは/およびペンタフルオロフェニルエステルであり、この場合反応性エステルのアルコキシ残基はメタクリル酸またはアクリル酸のカルボニルに直接結合するかまたはスペーサーリンカーを介して結合することができる。これらの種類のポリマーに使用するのに適当なスペーサーリンカーは一般に本技術分野において公知である。とく

に適当なポリマーにはポリ(N-ビニルピロリドン)、コポリ-(N-ビニルピロリドン-コ-無水マレイン酸)、コポリ-(N-ビニルピロリドン-コ-メタクリロイル-N-ヒドロキシコハク酸イミド、コポリ(N-(2-15-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド-コ-メタクリロイルp-ユトロフエニルエステル)および上述のモノマーによつて形成される他の共重合体が包含される。

本発明のポリマー結合阻害剤内に任意に導入されるリンカーまたはスペーサーは少なくとも2個の反応基をもたなければならない。反応基の一方は、ポリマー中に含有されるモノマー単位の少なくとも一部に存在する付加残基に共有結合できるものでなければならない。他の反応基は酵素の活性部位への結合に関与しない、遊離阻害剤分子中に存在する反応基に共有結合できるものでなければならない。適当なリンカーは本技術分野において公知であり、本明細書に詳しく記述する必要はない。本発明に使用するのに適当であることが明らかにされた1群のリンカーは、少なくとも2個の反応基を含有する可溶性パシクボーン炭化水素を含むものである。反応基としてはヒドロキシル、スルフィド、アミノ、カルボキシル、ヒドラジノおよびヒドラジドのような基がとくに適当である。しかしながら他の基も使用できる。リンカーまたはスペーサーの長さは特定の適当な要求によつて変動するものであ

る。通常は(C₆-C₂₀)炭化水素リンカー、好ましくは環状の炭化水素が使用される。しかしながら、他の種類の分子もこの場所に導入できる。

とくに適当な種類のリンカーは、最初と最後の炭素原子に共有結合された置換基を有する(C₁-C₂₀)炭化水素、たとえばヒドロキシアミン類からなるものであることが明らかにされた。本発明に使用するのに適した他の例には、α, ω-ジアミン類、α, ω-ジアミノアルコールおよびα, ω-ジアミノ酸である。

新規な置換カルバメート化合物ポリマー、それらを含む阻害組成物、およびこれらのポリマーを使用する方法では、たとえばプラズマエラストマーゼおよびヒト白血球エラストマーゼが特異的に阻害され、類似のセリン依存性プロテアーゼ、ウシ脾臓トリプシンおよびキモトリプシンには影響しない。

本技術分野においては、多形核白血球およびマクロファージからのプロテアーゼ、とくにエラストマーゼ(ヒト白血球HLEエラストマーゼおよびカタグリン)が炎症、関節炎および気腫に伴う慢性組織破壊の原因となることが知られている。感染または炎症時には、正常な肺は、プロテアーゼ阻害剤、α₁-アンチトリプシンによつて蛋白分解的消化から保護される。この保護機構は、遺伝的なまたは他の原因によつてα₁-アンチトリプシンが欠損した患者では作動しないようである。したがって、α₁-アンチトリプシンに置換できる

合成エラストマーゼ阻害剤が、肺気腫や関連疾患の治療に有用である。

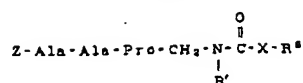
本発明によれば、動物およびヒトエラストマーゼの活性部位に向けられた阻害剤であるカルバメート官能基およびオリゴペプチドを含有する一群の公知化合物は、その複数単位を実質的に生体内で分解されないポリマーに結合させると、生物学的半減期の延長および/または効力の増強を示すことが明らかにされた。すなわち、ペプタジカルバメート鎖が多数結合したポリマーは単一の単位中に多数の阻害性残基を導入する機会を提供し、したがって酵素の活性部位へのアクリル化残基の移送効率が增大する。これにより、低分子量阻害性ペプチド自体に比べて、酵素に対するポリマー阻害剤の親和性は至適化される。

アシル化残基の性質は、所望に応じて、酵素の不活性化の持続を至適にするように変動できる。

本発明の機構は、カルバメートエステルがそのカルボニル炭素において、そのアルコキシ部分を失いカルバミル化残基を酵素の活性部位に移送することにより、プロテアーゼおよびエラストマーゼと反応するという事実を利用するものと理論づけられることができる。ついでアシル化で酵素活性の回復が起こる。

上述の提案においてエラストマーゼ阻害剤として活性を有する適当なカルバメート化合物には多種の化合物がある。これらの化合物は、オリゴペプチドで置換さ

れたカルバメートで、一般的にCは以下の一般式C



[式中、

ZはR¹O-SuC(式中R¹は(C₁~C₃)アルキルである)、CF₃CO-および/またはポリマーへのリンカーからなる群より選ばれ、

Xは酸素または硫黄であり、

R¹は直鎖状および二級分岐鎖(C₁~C₄)アルキル、(C₂~C₃)アルケニル、(C₂~C₄)アルキニル、(C₃~C₆)シクロアルキルおよびベンジルからなる群より選ばれ、

R²は、置換または非置換フェニル(この場合、置換基はニトロ、ペンタフルオロである)、ベンジル、CH₂CF₂CF₂CF₂、1-低級アルキルテトラゾリル、1-フェニルテトラゾリル、2-チオキノ-3-チアゾリジニル、ピリジルおよびベンゾチアゾリルである。

ただし、R²がp-ニトロフェニルの場合にはR¹は三級ブチル、ベンジルまたはシクロヘキシル以外であり、Xが硫黄の場合にはR²はベンジル以外である)で表すことができる。

さらに好ましい態様においては、阻害ペプチドは、以下の一般式DまたはE

適当なリンカーは、存在する特定の原子配位の種類に応じて、本技術分野でよく知られている。

本発明に使用するのに適当な阻害ペプチドは、アミノ部分がオリゴペプチドを含有し、ペプチド部分はエステラーゼに対するそのカルバメートエステルの特異性を増大させるように選択されたペプチジルカルバメートである。

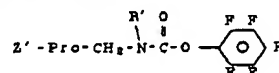
個々の阻害化合物に対するペプチドは、最終的にペプチドにカップリングさせる環状基が保護されたL-プロリンに始まる連続的な一連の反応によつて製造できる。最初の工程においては、N-保護プロリン、たとえばN-*t*-Boc-L-プロリンをジアルデヒドと反応させてジアルデヒドを得、ついでHClで処理してクロロメチルケトン保護L-プロリンを得る。このようにして得られたクロロメチルケトン保護L-プロリンを適当なアミンH₂NR¹と反応させて、保護アミン誘導体を形成させる。次にこのアミンを適当なクロロホルムートまたはチオクロロホルムートと反応させ、酸たとえばHClと反応させて脱保護するとHCl塩を与える。この化合物を次に、混合無水カルボン酸法でZ-Ala-Alaとカップリングさせると、本発明の化合物が得られる。Z-Ala-Ala化合物は、Ala-Alaを、ZがR¹O-SuCたとえばMeOSuCの場合には、メチルコハク酸N-ヒドロキシコハク酸イミドと反応させることによつて得られる。これらのZ-Ala-Ala中間体は、以下の反応式に従つて製造でき



(式中、

R¹は(C₁~C₃)アルキルまたはポリマーへの適当なリンカーであり、Xは酸素または硫黄であり、R²はフェニル、フルオロフェニル、ニトロフェニル、1-フェニルテトラゾリル、1-低級アルキルテトラゾリル、ベンジル、3-チアゾリジニル、ピリジルおよびベンゾチアゾリルからなる群より選ばれ、R¹は直鎖状または二級分岐鎖(C₁~C₄)アルキル、(C₂~C₄)アルケニルおよび(C₂~C₄)アルキニルである。

ただし、R²がp-ニトロフェニルの場合にはR¹は三級ブチル以外であり、Xが硫黄の場合にはR²はベンジル以外である)および

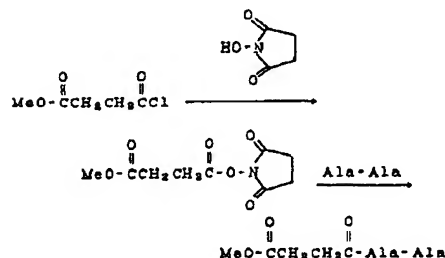


(式中、

Z'はMeO-SuC-Ala-Ala、CF₃CO-Ala-Alaおよびこの化合物をポリマーと連結する適当なリンカーからなる群より選ばれ、

R¹は先に定義したとおりであるが、好ましくはイソプロピルである)で表すことができる。

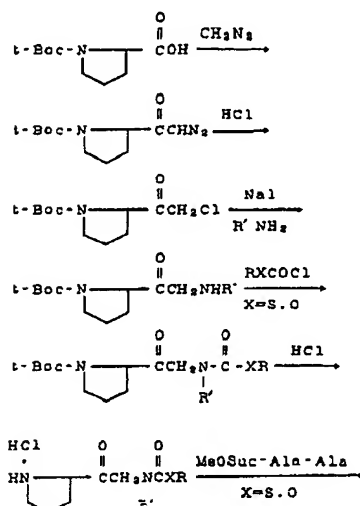
る。



これらの反応を実施するに際しては、最初の工程でL-プロリンは、本技術分野で公知の任意の適当な保護剤と反応させて環状基を保護する。したがって、反応は分子のカルボン酸部分にも起こることになる。好ましくは、環内窒素原子は公知の保護剤たとえば*t*-BOCで保護される。たとえば*t*-BOC-Proは、Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouriから市販されている。保護プロリンは、Paokeらの方法(B. Penke, J. Czombos, L. Balaspiri, J. PetersおよびK. Kovacs: Helv. Chim. Acta, 53:1057, 1970)によつてジアルデヒドと反応させる。得られたクロロメチルケトンに次に適当なアミンと反応させる。反応は、溶液相酸たとえば低級アルキルアルコール中、好ましくはヨウ化アルカリ金属の存在下に行うのが好ましい。反応原料を冷却下に混合し、ついで5.0~

75℃で反応させて、反応を完結させる。生成したHClをたとえば炭酸ナトリウム溶液で中和し、抽出する。この中間体を次に適当なクロロホルムまたはテオクロロホルムと反応させ、ついで塩化水素で脱保護すると、分子のカルバメート部分が形成される。この分子を次に、分子のペプチド部分とカップリングさせると、最終生成物が形成する。

この反応操作は次のように例示することができる。

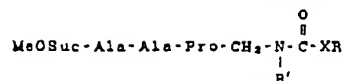


によって実施した。

反応は定量的に、Whatman MK 6 フシリカゲルプレートを用い、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって追跡した。スポットは紫外分光光度法 (254 nm)、ヨウ素または HBr-エンヒドリン噴霧によって検出した。カラムクロマトグラフィーは Silica Gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて実施した。化合物はすべて、スペクトルデータおよび元素分析によって同定した。

ポリマーへの阻害剤の負荷は、直接またはリンカースペーサーを用いて、本技術分野において公知の化学反応により実施する。その詳細は本明細書に記載するまでもない。負荷の程度、すなわち、ポリマー鎖に沿った PC 単位の密度は、所望の負荷に応じて最適になるように変動させることができる。これは実験条件、たとえばポリマー鎖上の付加反応性残基の数、スペーサー基の数、および/または反応混合物中の PC とポリマーの比を変動させることによって達成できる。以下の実施例では、特定の反応方式について述べるが、これらはいかなる意味でも本発明を限定するものではない。

以上、本発明について一般的に説明したが、以下の特定の実施例を参照すれば、本発明はより完全に理解できるものとする。しかしながら、本明細書に述べる特定の実施例は単に例示の目的のものであつて、と



上に指摘したように、本発明のポリマーは腫瘍エラストマーの特異的な、活性部位に対する阻害剤として使用できる。この目的では、ポリマーは、注射または経口用剤形による *in vivo* 投与用に、医薬的に許容される宿主と配合することが好ましい。

慣用の補助剤および宿主が、約 1~90 重量部の活性ポリマーと配合して用いられる。このポリマーは、動物またはヒトに、約 0.1 mg/kg~300 mg/kg、好ましくは約 1 mg/kg~30 mg/kg、さらに好ましくは平均約 12 mg/kg の用量で投与できる。

以下の実施例には、本発明の好ましい態様を例示するが、これらは本発明を限定するものではない。実施例および本明細書を通じて、部はとくに指示のない限り重量部である。

本発明の化合物の合成に際しては、融点を Thomas-Hoover Unibelt 装置で測定し、補正していない。¹H NMR スペクトルは、Varian EM-360 (60 MHz) または EM-390 (90 MHz) スペクトロメーターを用いて測定した。赤外 (IR) スペクトルは Perkin-Elmer 567 スペクトロフォトメーターを用いて記録した。微量分析は Atlantic Microlab, Inc., Atlanta, Georgia または Micro Analysis, Inc., Wilmington, Delaware

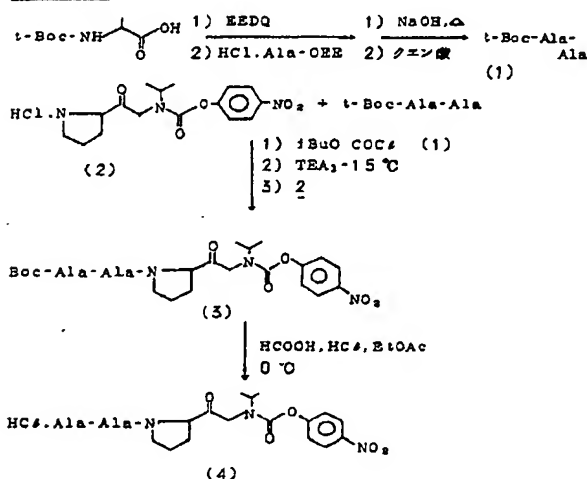
くに指示のない限り、本発明またはその実施態様の限定を意図するものではない。

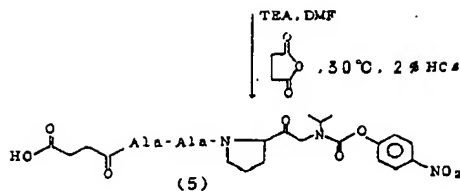
例

例 1

重合体に固定した阻害剤の製造に適用したペプチジルカルバメート阻害剤 (化合物 5) を下記スキーム 1 により本発明方法に従って調製する。

スキーム 1





この方法の個々の工程を下にもつと詳しく述べる。

例 2

L-Boc-L-アラニル-L-アラニン(化合物1)の合成

$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (4:1) 中 L-Boc-L-アラニン (5.9 g, 31.2 ミリモル) および L-アラニンエチルエステル塩酸塩 (4.8 g, 31.2 ミリモル) の溶液へ、かきまぜながら塩酸でトリエチルアミン (4.3 ml, 31.2 ミリモル) を加える。

この反応混合物へ、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン (EEDQ) (8.0 g, 32.3 ミリモル) を加え、かきまぜを一晚続ける。

次に混合物を CH_2Cl_2 (100 ml) で抽出し、10 % クエン酸 (50 ml × 3) および 5 % NaHCO_3 (50 ml) で洗浄する。有機層を乾燥し (Na_2SO_4)、真空中で濃縮する。

得られた油状物を EtOH (100 ml) に溶かし、1.0 N KOH 30 ml を加え、混合物を 35 ~ 40 °C で一晚かきまぜる。EtOH の蒸発後クエン酸 (H_2O 50 ml 中 14

10 % クエン酸 (3 × 100 ml) で洗浄し、乾燥し (Na_2SO_4)、溶液を蒸発させて油状物を得る。

酢酸エチル (EtOAc) で溶解して固体を得、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (6 % $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) により精製して化合物 3 (90 %) を得る。

化合物 3 の諸特性は次の通りである：

融点：170 - 172 °C

IR (KBr) ν_{max} 1730, 1650, 1520, 1345, 1190, 1155 cm^{-1} ；

NMR (CDCl_3) デルタ 8.20 (2 H, d, $J=9$ Hz), 7.20 (2 H, d, $J=9$ Hz), 4.1 - 4.5 (tH, m), 3.5 - 3.7 (3 H, m), 2.0 (4 H, m), 1.5 (9 H, s), 1.7 - 1.6 (21 H, m)。

例 4

p-ニトロフェニル-N-(L-アラニル-L-アラニル-L-1-L-プロリルメチル)-N-インプロピルカルバメート塩酸塩(化合物4)の合成

EtOAc (7 ml) 中化合物 3 (0.7 g, 1.02 ミリモル) のかきまぜ溶液へ酢酸 (1.25 ml) を加える。次にこの反応混合物中に無水 HCl を通気し、反応を薄層クロマトグラフィー (TLC) により追跡する。溶液を蒸発させ、p-ヘプタンの添加により酢酸を共沸混合物に捉える。得られた油状物をそれ以上精製することなく次の工程で用いる。

例 5

9) を加えて過剰の KOH を中和する。

次に反応混合物を EtOAc / テトラヒドロフラン (THF) (1:1 混合物 150 ml × 2) 中に抽出し、乾燥する (Na_2SO_4)。次に溶液を蒸発させて生成物 (1) を得、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 10:1) により精製する (12.1 g, 74 %)。融点 89 ~ 91 °C。
(Doyle, B.B.; Traub, W.; Lorenz, G.P.; Brown, F.R.; Blout, E.R., J. Mol. Biol., 51: 47 (1970) による)

例 3

p-ニトロフェニル-N-(L-Boc-L-アラニル-L-アラニル-L-1-L-プロリルメチル)-N-インプロピルカルバメート(化合物3)の製造

-30 °C に冷却した THF (30 ml) 中化合物 1 (1.0 g, 3.9 ミリモル) の溶液へ N-メチルモルホリン (0.46 ml, 4.2 ミリモル) を加え、混合物を 5 分間かきまぜる。THF (2 ml) 中インプロピルクロロホルム (0.55 ml, 4.2 ミリモル) を加え、かきまぜを -15 °C で 10 分続ける。

この反応混合物へ、アセトニトリル (40 ml) 中化合物 2 (1.3 g, 3.5 ミリモル) および N-メチルモルホリン (0.46 ml, 4.2 ミリモル) の懸濁液を -40 °C で加え、かきまぜを室温で 1 時間続ける。

次に反応混合物を濃縮し、濃液を CHCl_3 で抽出し、

p-ニトロフェニル-N-(スチニル-L-アラニル-L-アラニル-L-1-L-プロリルメチル)-N-インプロピルカルバメート(化合物5)の合成

DMF (20 ml) 中化合物 4 (1.5 g, 2.9 ミリモル) の溶液へ Et_3N (0.5 ml, 3.6 ミリモル) および無水コハク酸 (0.35 g, 3.6 ミリモル) を加え、混合物を 80 °C で 1.5 時間かきまぜる。次にジエチルエーテル (60 ml) をこの冷却した混合物へ加え、沈殿した $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$ を濾過し、濾液を蒸発させて淡黄色固体を得る。次に生成物を 2 % HCl とすりませ、濾過し、テトラヒドロフラン (THF) / エーテルから再結晶して化合物 5 (PC) 1.6 g (94 %) を得る。

化合物 5 の諸特性は次のようである：

融点：185 - 186 °C

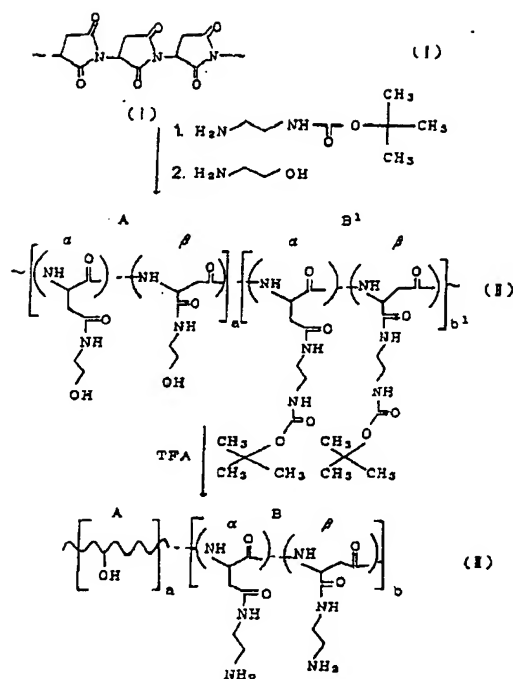
IR (KBr) ν_{max} 3300, 2700, 1780, 1750, 1651, 1560, 1200 cm^{-1} NMR ($\text{DMSO}-d_6$) デルタ 8.3 (2 H, d, $J=9$ Hz), 1.06 - 1.6 (26 H, m)。

分析： $\text{C}_{66}\text{H}_{78}\text{N}_{10}\text{O}_{10} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ に対する計算値：C, 53.43；H, 6.17；N, 11.94。実測値：C, 53.34；H, 8.41；N, 11.93。

例 6

例 1 に従い調製したペプチジルカルバメートヘミスチンネート (スキーム 1 の化合物 5) を重合体担体に固定する。全体の手順を次のスキーム 2 で説明する。

スキーム 2 : 例 2 の重合体固定 PC 阻害剤の合成



反応混合物を室温に 4 日間放置し、次に 2-アミノエタノール 11.0 ml (0.18 モル) を加え、反応を更に 24 時間続ける。

次に混合物を酢酸で中和し、水に対して透析し、凍結乾燥により重合体を単離する。

収量: PHEA(AE-BOC) (スキーム 2 の化合物 II) 9.20 g。

PHEA(AE-BOC) (化合物 II) 8.50 g をトリフルオロ酢酸 30 ml に溶かす。溶液を室温に 1 時間放置し、次に蒸留水に対して透析する (Visking Dialysis Tubing, Serva)。

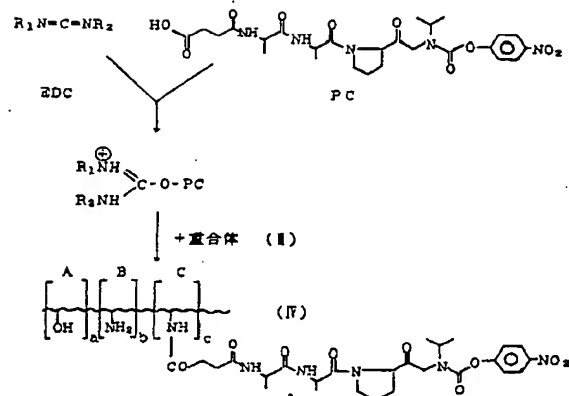
透析した溶液を次に Amicon YM10 膜上での限外濾過により体積 30 ml まで濃縮し、再び水で 200 ml まで希釈する。限外濾過を同じ方法で 5 回繰り返す。リテンテートから凍結乾燥により重合体を単離する。

収量: PHEA(AE) (スキーム 2 の化合物 III) 6.5 g

例 8

アミノエチルスベアールンによるペプチジルカルバメート-ヘミスクシネートの重合体への固定 (PHEA-AE)

ペプチジル-カルバメート-ヘミスクシネート (スキーム 1 の化合物 5) (0.586 g, 0.001 モル) および N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (0.23 g, 0.0012 モル) を DMF 4.0 ml 中で 45 分間氷浴の中で反応させる。次に DMF 12 ml 中に重合体 2.20 g (-NH₂ 0.0012 モル) とトリエチルアミン 0.167 ml (0.0012 モル) を含む氷冷却液を加え、反応混合物を 0~4℃で 24 時間かきまぜる。



例 7

担体重合体の合成

Vlasak, J., Rypacek, F., Drobnik, J., Saudek, V., J. Polymer Sci., Polymer Symp., 66: 59-64 (1979) により記述された方法に従ってポリスクシニミド(I)をつくり、分別する。

ポリスクシニミド(I) (分子量 32,000 をもつ面分) 10 g を N, N'-ジメチルホルムアミド (DMF) 50 ml に溶かし、モノ-N-Boc-1,2-ジアミンエタンペンタエート 2.80 g (0.01 モル) およびトリエチルアミン 0.8 ml (0.01 モル) を加える。

次に重合体生成物を NaCl 0.15 M を含む pH 7.0 のリン緩衝液に対して透析する。透析した重合体を、同じ緩衝液中 Sephadex G25F カラム (50 × 300 mm) 上でのゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により更に精製し、集めた重合体フラクションを Amicon YM10 膜による限外濾過と希釈によつて脱塩する。この重合体阻害剤を凍結乾燥により水から単離する。

収量: PHEA(AE-PC) (スキーム 2 の化合物 IV) 1.35 g

例 9

担体重合体および重合体固定阻害剤の同定と特徴づけ

すべての重合体の分子量分布分析を混合床カラム (Sephacose CL-4B: Sephacryl S200SF: Sephadex G-25SF, 16:5:3; 13 × 350 mm) 上でのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により行なう。

透析剤として NaCl 0.15 M を含有する pH 7.5 の 0.05 M リン緩衝液を用いる。

カラムを PHEA の標準試料を用いて校正する。 (Rypacek, F., Saudek, V., Pytela, J., Skarda, V., Drobnik, J., Makromol. Chem. Suppl. 9: 129-135 (1985))。

精製の概略を 5150 モデル 1840 分光光度検知器によりモニターする。分子量の平均値 (M_w および M_n) および累積分子量分布を SEC データから計算す

る。これらデータを第2図に示す。

重合体ⅢおよびⅣにおけるアミノエチル側鎖含量を、Brown, H.H., Clin. Chem., 14: 967, (1968)に従いアミノエチル基と2, 3, 5-トリクロロベンゼンスルホン酸との反応後に分光光度計で決定する。データを下記表1に示す。

表 1: 重合体固定阻害剤の分子特性

重合体 構造	組成 (%)			分子量 平均値	
	A	B	C	Mw	Mn
Ⅲ	91.2	8.8	0	31,600	21,000
Ⅳ	91.2	4.2	4.6	38,000	24,000

1個のPC単位当りの分子量当量: 4042、即ち重合体固定PC 0.247μモルPC/μg

重合体固定阻害剤におけるペプチジルカルバメート単位含量を、上記PC阻害剤の276nmにおけるモル吸光係数に対し9700モル⁻¹1cmの値を仮定して重合体・阻害剤(重合体Ⅳ)の吸収スペクトルから決定する(データを第3図に示す)。

遊離PCと重合体Ⅲとの間の結合反応の時間的進行をGPCで追跡する。典型的には反応混合物の試料10μlを適当な時間間隔で抜き取り、リン酸緩衝液(例えば、PBS)で希釈し、Sephadex G-25 SF 11×40mm)カラムに適用する。重合体固定PC阻害剤と

未固定分子量PC阻害剤との比を、276nm(遊離PCに対する吸収極大)における光学密度としてモニターした溶出曲線のそれぞれのピーク下の面積から決定する。結果を第4図と第5図に示す。

例 10

6-アミノヘキシルスパーサー鎖をもつポリ-α, β-(N-(2-ヒドロキシエチル)-D, L-アスパラギン酸アミド)共重合体を例2で述べた全体の手順に従ってつくるが、ただしモノ-N-ε-BOC-1, 2-ジアミノエタンの代わりにモノ-N-ε-BOC-1, 6-ジアミノヘキサジン塩酸塩を用いた。PHEA(AH)172μg(-NH₂基0.1ミリモル)を、例1で調製したペプチジルカルバメートヘミスクシネート(スクーム1の化合物5)58.6μg(0.1ミリモル)とN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)塩酸塩23.0μg(0.12ミリモル)と、ジメチルホルムアミド(2ml)中トリエチルアミン0.12ミリモルの存在下0~4℃の温度で20時間反応させる。この重合体生成物を水に対して透析し、Sephadex G-25 Fカラム(Pharmacia)上でGPCにより更に精製し、重合体阻害剤を凍結乾燥により水から単離する。収量: PHEA(AH-PC)118μg。最初に反応に加えたPCの68μgが重合体に結合するので、6.2μgのPC側鎖を含む重合体固定PCを生ずる。

例 11

-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)塩酸塩を使用して、例1で得たペプチジルカルバメートヘミスクシネート(スクーム1の化合物5)58.6μg(0.1ミリモル)と反応させる。例2で述べた方法と同様の手順を用いることにより、PVP型共重合体に固定されたPC115μgを得る。得られた重合体阻害剤におけるPC阻害剤部位の含量は、共重合体の全単量体単位から4.8μgと決定された。

例 12

デキストラン(分子量70,000; Pharmacia Uppsala, スウェーデン)1.62gをpH8.00の0.1モル⁻¹ホウ酸緩衝液40mlに溶かし、1, 2-エポキシ-3-プロモプロパン1.08gを加え、混合物を30℃で4時間激しくかきまぜる。次に反応混合物を酢酸エチルで抽出し、水層を分離し、これに濃水酸化アンモニウム20mlを加え、溶液を室温で24時間かきまぜる。次に溶液を中和し、蒸留水に対して透析し、得られたデキストラン誘導体(Dextran-NH₂)をSephadex G-25カラム上でのGPCによつて最終的に精製する。収量0.84g。分析したところアンヒドログルコース単位1モルにつきNH₂基15個(6.2μg)を示した。

例1に従い調製したペプチジル-カルバメートヘミスクシネート阻害剤(スクーム1の化合物5)58.6μg(0.1ミリモル)をDMF 1.0ml中0℃でEDC 21μg

メタクリルオキシ-N-オキシ-スクシンイミドコモノマー8μgを含む0.1mlメタクリロイル-N-オキシ-スクシンイミドとN-2-ピニルピロリドンの共重合体(p(VP-CO-MANSu))を、開始剤としてアゾ-ビス-イソ-ブチロニトリルを用いて前記コモノマーをジオキサン中で共重合させることによりつくる。1.46gのp(VP-CO-MANSu)共重合体(N-オキシ-スクシンイミドエステル基1ミリモル)を、DMF(1.0ml)中トリエチルアミン2ミリモルの存在下PCモノ-ε-BOC-1, 6-ジアミノヘキサジン塩酸塩0.51g(2.0μmol)と50℃の温度で48時間反応させる。次にこの重合体生成物を蒸留水に対して透析し、次に溶液を約5mlの体積まで濃縮し、トリフルオロ酢酸5mlを加える。反応混合物を室温に4時間放置してから蒸留水に対して透析し、重合体をSephadex G-25 Fカラム上でGPCにより更に精製する。(Sephadex: Pharmacia Uppsala, スウェーデンの商標)。重合体ポリ(VP-CO-MA-AH)、即ちN-2-ピニルピロリドンとN-(6-アミノヘキシル)メタクリルアミドとの共重合体を凍結乾燥により水溶液から単離する。アミノヘキシルスパーサー鎖のモル含量は、共重合体の全単量体単位から8.9μgと測定される。

ポリ(VP-CO-MA-AH)149μg(-NH₂基0.1ミリモル)を、カップリング剤としてN-エチル-N'-(3

特表平3-505210 (15)

(0.11ミリモル)と反応させる。60分後、pH 9.00の0.1モル l^{-1} ホウ酸緩衝液2ml中上記 Dextran-NH₂ 260mgの溶液を加え、混合物を氷浴中で更に16時間かきまぜる。次に反応混合物を3mlの0.3モル l^{-1} NaClで希釈し、Sephadex G-25カラム上に適用する。デキストラン固定PC阻害剤を、集めた高分子量フラクションから凍結乾燥により単離する。

収量：210mg、アンヒドログルコース単位1モル当たりPC阻害単位3.2モル多。本発明に従い調製した重合体固定阻害剤によるエラストラーゼ活性の阻害を、下に詳細に述べた手順により評価する。

例13

酵素活性阻害試験

すべての酵素検定はCARY 219または2200 Varian分光計を使用して25℃で分光光度法により行なつた。PPEの活性は基質として5-Boc-L-アラニンP-ニトロフェニルエステル(Boc-Ala-ONP)を使用し、347.5nm(p-ニトロフェノール)における吸光度をモニターすることにより測定する。HLEの活性は、基質としてメトキシスクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリン-L-バリンp-ニトロアニリド(MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NA)を使用し、410nm(p-ニトロアニリン)における吸光度を追跡することにより測定する。活性阻害剤は、

光度を釣合わせる。

試料セルへPPE(緩衝液中0.1ml)を加え、また対照セルへは緩衝液0.1mlを加える。混合物を20秒間振り、吸光度増加を30分モニターする。

対照実験

阻害剤溶液の代わりに0.1mlのジメチルスルホキシドを両方のセルに加える。

酵素検定法

例14

重合体固定PC阻害剤および遊離PC阻害剤のK_iを決定する定常状態反応速度

試薬：

緩衝液：

0.1M HEPES(N-2ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸)緩衝液(pH7.5)、0.05M NaClおよび10%ジメチルスルホキシドを含む。

基質：MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NA、(1.27, 8.47, 4.23)×10⁻³

M(ジメチルスルホキシド中)

酵素：HLEに対して：0.05M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)4.2ml中0.27mg

阻害剤：0.05Mリン酸二水素カリウム緩衝液(pH6.5)中重合体固定阻害剤

(2.09, 1.05, 0.42, 0.21)×10⁻³M

他のセリン依存性タンパク質分解酵素、例えばトリプシンおよびキモトリプシンに対して、これらのそれぞれの基質、即ちN-ベンザイル-L-アルギニンエチルエステル、N-ベンザイル-L-チロシンエチルエステルを使用し、それぞれ253nmおよび256nmにおける吸光度をモニターすることにより試験する。

スクリーニング試験(時間経過)PPEおよびHLEの検定

緩衝液：PPEに対して0.05Mリン酸二水素ナトリウム緩衝液、pH6.5

HLEに対して0.1M HEPES(N-2ヒドロキシエチルピペラジンN-2エタンスルホン酸)

緩衝液pH7.4、0.5M塩化ナトリウムと10%ジメチルスルホキシドを含む

基質：PPEに対して、t-Boc-Ala-ONP(メタノール中1.0×10⁻³M)、

HLEに対して、MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NA(ジメチルスルホキシド中1.0×10⁻³M)

阻害剤：ジメチルスルホキシド中2.0×10⁻³M

酵素：PPEに対して、0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)5ml中1.5mg

HLEに対して、0.05M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)2.4ml中1mg

操作：阻害剤0.1mlと基質0.1mlを、2個の石英セル中リン酸ナトリウム緩衝液2.7mlへ加える。セルを分光光度計中で2分間熱平衡させ、347.5nmで吸

遊離阻害剤：ジメチルスルホキシド中

(6.98, 3.49, 1.74, 0.70)×10⁻³M

操作：

2個の石英セルの各々に入れられたHEPES緩衝液1.9mlへ、基質33μl、阻害剤33μl、およびジメチルスルホキシド33μl(または、遊離PC阻害剤試験に対してはHEPES緩衝液33μl)を加える。セルを分光光度計中25℃で2分間熱平衡させ、410nmにおける吸光度を釣合わせる。

試料セルへ酵素(33μl)を加え、標準側のセルへは0.05M酢酸ナトリウム緩衝液(33μl)を加える。混合物を15秒間振つた後、410nmにおける吸光度の増加を3分間モニターする。

対照

対照実験は、重合体固定PC阻害剤の代わりに0.05Mリン酸二水素カリウム緩衝液(pH6.5)33μl(または、遊離PC阻害剤の代わりにジメチルスルホキシド33μl)を加えることにより行なう。

DixonプロットおよびLineweaver-Burkeプロットの勾配プロットからK_i値を決定する。重合体固定遊離PC阻害剤に対するK_iは8.0×10⁻⁷Mまた遊離PC阻害剤に対するK_iは0.4~1.0×10⁻³Mである。

例15

グリーンキニペーシン法

(残留酵素活性パーセント)(K_i 測定のため)

試薬:

緩衝剤: 0.05 M 塩化ナトリウムおよび10 mM ジメチル
スルホキシドを含有する0.1 M HEPES 緩衝液 (pH
7.5)

基質: ジメチルスルホキシド中

MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NA, 1.26×10^{-3} M

阻害剤: 0.05 M NaCl および10 mM ジメチルスルホ
キシドを含有する0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中、
重合体固定遊離 PC 阻害剤 (4.56, 1.82, 0.91,
0.45) $\times 10^{-3}$ M

酵素: 0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 中
 2.1×10^{-6} M

操作: 石英セル中の0.1 M HEPES 緩衝液 1.9 ml へ阻害
剤 33 μ l および酵素 33 μ l を加え、混合する。標準
側セルは、阻害剤 33 μ l 0.05 M 酢酸ナトリウム緩
衝液 33 μ l, および0.1 M HEPES 緩衝液 1.90 ml を
含む。

セルを分光光度計中で2分間熱平衡させ、410 nm
で吸光度を約合わせる。予定のインキュベーション時
間 (2.5 ~ 20 分) の終りに、標準セルおよび試料セ
ルの両方に33 μ l の基質を加え、混合物を15秒間
振る。次に反応を3分間モニターし、p-ニトロアニ
リンの遊離を410 nm で記録する。

対照

nm で3分間追跡する。標準側のセルへは酵素の代り
に0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (33 μ l) を加え
る。

対照実験

上記と同様に行なうが、しかし阻害剤の代りに0.1
M HEPES 緩衝液 33 μ l を加える。

速度対阻害剤濃度プロットを用いて重合体固定 PC1
と酵素との間の堅固な結合の存在を裏証する。

上記手順によつて得られたデータは、遊離ペプタジ
ルカルバメート阻害剤のエラスターゼ阻害能力 (EIC)
が保持されるだけでなく、水溶性重合体に結合したと
き向上することを示している。

酵素-阻害剤複合体の解離定数 (K_i) は阻害力の係
数として使用できる。これを行なうときは、重合体に
PC 阻害剤を結合すると、 K_i 値が少なくとも700
倍減少するのが観察され、阻害力の向上の示すことが
分かる。第1図は遊離 PC 阻害剤 (PC-1)、重合体固
定 PC 阻害剤 (PHEA-(AB)-PC) (P-PC11) およびエラス
ターゼ、即ちアルファ-1 プロテナーゼ阻害剤 (アル
ファ-1-PI) の阻害活性の比較を示している。重
合体固定 PC 阻害剤が、この場合1.6モル多といった
低含量の PC 単位を含んでも、アルファ-1-PI と
少なくとも同程度に活性である。

重合体 PHEA は毒性を欠くことが示された (Neri, P.;
Antoni, O.; Benvenuto, F.; Cocola, P. and Gazzel,

対照実験を上記のように行なうが、ただし阻害剤の
代りに0.1 M HEPES 緩衝液 33 μ l を使用し、100
% 活性とみなす。

K_i 値は阻害剤濃度に対する K_{obs} (阻害に対する逆
一次速度定数) の逆数プロットから得られる。

例16

重合体に固定した遊離 PC 10 阻害剤に対する堅固
な結合の有無の決定

試薬:

緩衝剤: 0.05 M NaCl および20 mM ジメチルスルホ
キシドを含有する0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.5)

基質: ジメチルスルホキシド中

MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NA, 4.23×10^{-3} M

阻害剤: 0.05 M NaCl および10 mM ジメチルスルホ
キシドを含有する0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中
(5.58, 2.79, 20 2.15, 1.86, 1.40,
0.933, 0.698, 0.349, 0.209, 0.105)
 $\times 10^{-4}$ M

酵素: 0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 中 2.25
 $\times 10^{-6}$ M

操作: 2個の石英セルの各々に入れた0.1 M HEPES 緩
衝液 1.9 ml へ基質 33 μ l および阻害剤 33 μ l を加え、
25℃で2分間熱平衡させ、410 nm で吸光度を約
合わせる。試料セルへ酵素 (33 μ l) を加え、混合
物を15秒間振る。p-ニトロアニリンの解放を410

O., J. Med. Chem., 16: 893-897 (1973)).
事実、40日間にわたる極端な耐毒性のためマウスや
ラットで LD₅₀ を測定できない。PHEA をヒトに用いる
量より10倍大きい用量で毎日静脈内注射をしても全
体重取得または臓器重量に有意な変化を起こさない。
更にまた、血清タンパク質あるいは血球の生合成機構
に及ぼす PHEA の悪影響は観察されたことがない
(Neri 等、前記)。

更にまた、PHEA は抗原性を欠くことが示された。
PHEA を多数の免疫化パターンに従い家兎およびモ
ットに注射したとき、免疫反応の徴候は見られない
(Neri 等、上記)。

本発明を詳しく記述したが、本発明の主旨あるいは
範囲から離れることなく多くの変換および修飾をなし
うることは当業者にとつて明白であらう。

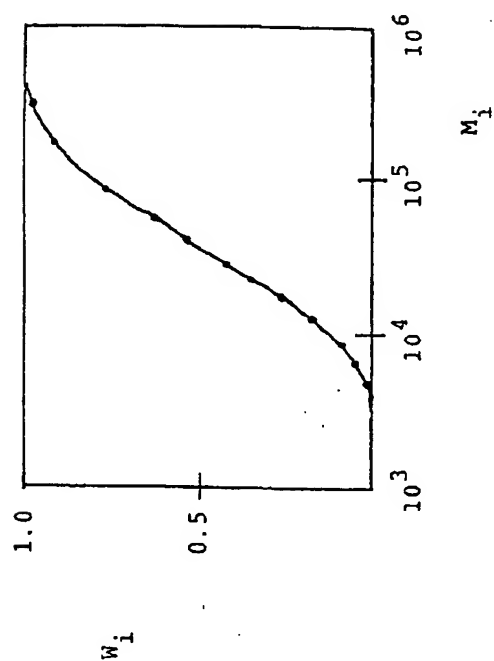


FIG. 2

FIG. 1
浄重(内容に変更なし)

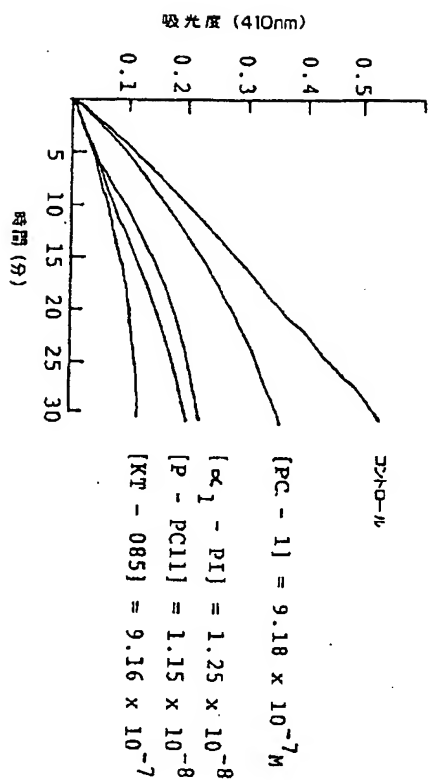


FIG. 3

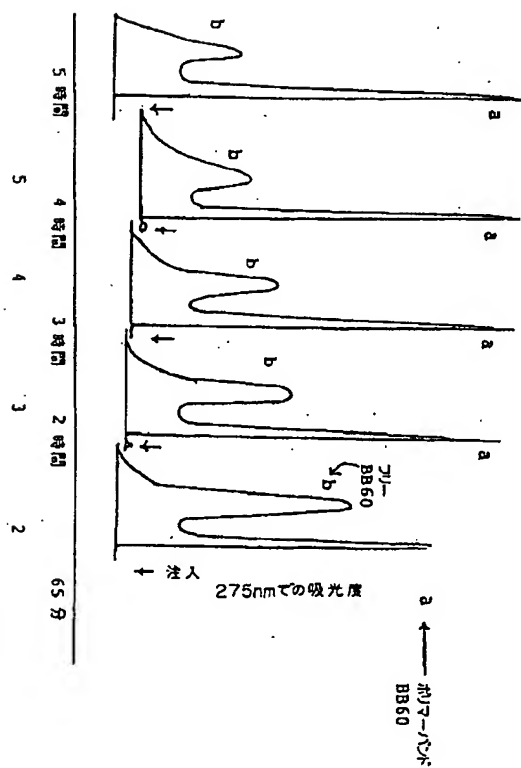
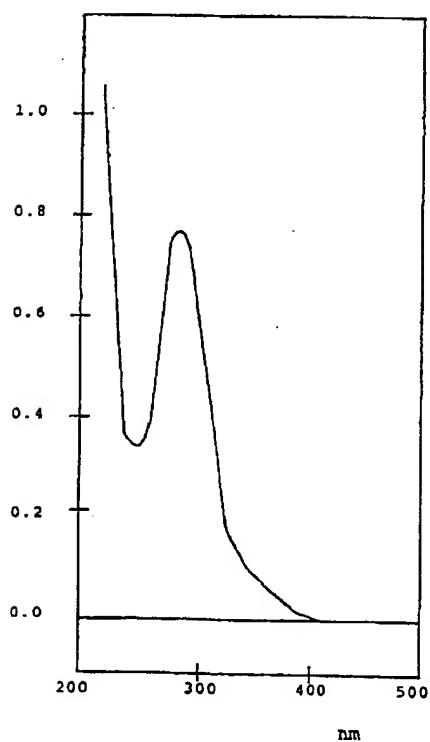


FIG. 4

平成 2 年 6 月 26 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

PCT/US89/03908

2. 発明の名称

エラストマーゼ阻害ポリマーおよび方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ユニバーシティ オブ ケンタッキー
リサーチ ファウンデーション

4. 代理人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビルディング331
電 話 (211) 3651 (代表)
氏 名 (6669) 浅 村 皓

5. 補正の対象

明細書及び請求の範囲翻訳文

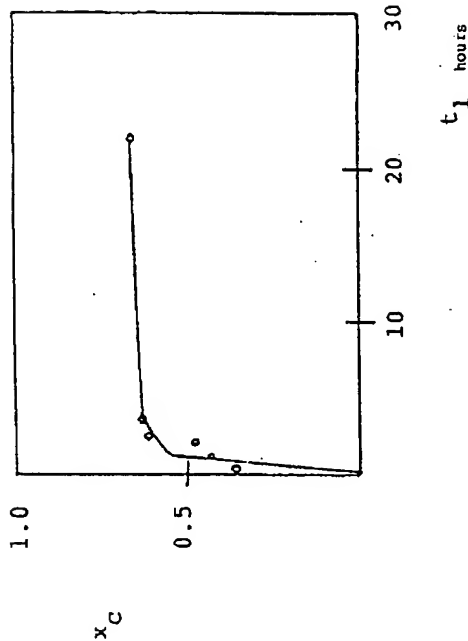
6. 補正の内容

別紙のとおり

明細書及び請求の範囲翻訳文の浄書
(内容に変更なし)

特 許 庁
2 6 2 6

FIG. 5



手続補正書 (方式)

平成 3 年 8 月 26 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成 1 年 特許願第 5/0119 号
PCT/US89/03908

2. 発明の名称

エラストマーゼ阻害ポリマーおよび方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
氏名 (名称)

ユニバーシティ オブ ケンタッキー リサーチ
ファウンデーション (ほか 1 名)

4. 代理人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビルディング331
電 話 (211) 3651 (代表)
氏 名 (6669) 浅 村 皓

5. 補正命令の日付 平成 3 年 4 月 18 日

6. 補正により増加する請求項の数

7. 補正の対象

特許法第184条の5第1項の規定による書面の
発明者住所の
法人格証明書及びその訳文各1通 (Czechoslovak Academy
of Sciences 9分)

図面添付
代理店に送付

特 許 庁
3 R 2 7
国際出願室

8. 補正の内容 別紙のとおり

国際調査報告

Multiple Application No. PCT/US89/03908

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's Classification)		
IPC(4) A61K 37/02; C07K3/08; C07K4/708 and 4708 USCL:530/331; 514/18,19; 525/54.1		
2. FIELD OF SEARCH		
Classification System	Classification System	
US	514/18,19, 530/331; 525/54.1	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Document or Disclosure	Relevance to Claim No. 1
Y	US, A 4,494,689 (Mittra) 29 January 1985 See Cols. 5-9.	1-21
A	US, A 4,499,002 (Shenoi et al.) 12 February 1985 See entire Document	1-21
A	US, A 4,711,722 (Doherty et al.) 05 January 1988 See Entire Document	1-21
A	US, A 4,752,376 (Brake et al.) 21 June 1988 see Entire Document	1-21
P, A	US, A 4,797,396 (Finke et al.) 10 January 1989 See entire Document	1-21
P, A	US, A 4,801,610 (Miyano et al.) 31 January 1989 See Entire Document	1-21
P, A	US, A 4,812,674 (Campbell et al.) 14 March 1989 See Entire Document	1-21
4. REPERCUSSIONS		
Date of the present Application or the International Search: 03 December 1989		
Date of the International Search Report: 09 JAN 1990		
Signature of the International Searcher: Lester L. Lee		

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 1	識別記号	庁内整理番号
// A 61 K 37/64	ACD	8615-4C
C 08 G 69/10	NRN	9053-4J
C 12 N 9/99	NRH	9053-4J

⑦発明者	バンクス, ウィリアム, アー ル。	アメリカ合衆国40222 ケンタッキー州ルイズビル, ウイツブスミ ル ロード 8508
⑦発明者	リイバセツク, フランティセツ ク	チエコスロバキア国16206 ブラギユ 6, ヘイロブスキー スクワ エアー 2, インスタチユート オブ マルクロモレキユラー ケミ ストリイ 気付
⑦発明者	アグハ, ブシユラ	アメリカ合衆国10954 ニューヨーク州ナヌエツト, ニュー ホラ ンド ビレツジ 57
⑦出願人	チエコスロバーク アカデミー オブ サイエンシース	チエコスロバキア国111 42 プラハ スタレ メスト, ナロード ニ 3